

Die Wirkung von Vinblastin auf Chinesische Hamsterzellen

Johann Ludwig Roithmeyer

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der
Universität München

Die Wirkung von Vinblastin auf Chinesische Hamster-
zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Johann Ludwig R o i t h m e y e r
aus Haar

München 1979

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. K.-R. Trott

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Wilmanns

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.4.1980



Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. K.R. Trott für die Überlassung des Themas, für seine wertvollen Anregungen, die zum Gelingen meiner Dissertation wesentlich beitrugen, für die kritische Durchsicht des Entwurfs der Dissertation, sowie für seine Hilfe und Erfahrung, die er mir jederzeit zur Verfügung stellte.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Eichholz für die Mitgestaltung bei der Versuchsplanung, sowie Frl. H. Pfeifer für die Einarbeitung in die Methodik und Frl. I. Fuhrich für Hilfestellungen während der Laborarbeit.

Weiterer Dank gilt Frau Bayer für die mathematische Beratung zur Versuchsauswertung.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material, Arbeitsweise und Methode	2
2.1.	Material	2
2.1.1.	Zelltyp	2
2.1.2.	Nährlösung	2
2.1.3.	Salzlösung nach Hank	3
2.1.4.	Fixier- und Färbelösung Methylenblau	3
2.1.5.	Vinblastin	3
2.1.6.	Solution A	3
2.1.7.	Trypsinlösung	4
2.2.	Arbeitsweise	4
2.2.1.	Zellpassage	4
2.3.	Methode der Versuchsdurchführung	5
2.3.1.	Plating Efficiency	6
2.3.2.	Versuchsausählung	6
2.3.3.	Systematik der Vorversuche	7
2.3.3.1.	Spülversuche	7
2.3.3.2.	Aktivitätstestung	10
2.3.3.3.	Inaktivierung	12
2.4.	Methode der Hauptversuche	15
2.4.1.	Bestimmung der Zeit - Überlebensrate - Konzentrationsbeziehung	15
2.4.2.	Bestimmung der Mitoseverteilung bei den verschiedenen Vinblastinkonzentrations- tionen	16
3.	Hauptversuche	16
3.1.	Ergebnisse der Zeit - Überlebens- rate - Konzentrationsbeziehung	16

3.2.	Ergebnis der Mitoseverteilung bei den verschiedenen Vinblastinkonzentrationen	30
4.	Diskussion	32
4.1.	Allgemeines zur Wirkung von Vinblastin	32
4.1.1.	Struktur des Vinblastins	32
4.1.2.	Pharmakologische Wirkungen des Vin- blastins	32
4.1.2.1.	Mitosehemmung	32
4.1.2.2.	Wirkung auf Zellorganellen	33
4.1.2.3.	Biochemische Effekte	34
4.1.2.4.	Chromosomenschäden	35
4.1.2.5.	Metabolismus	35
4.2.	Diskussion der eigenen Ergebnisse	36
4.2.1.	Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse	36
4.2.2.	Beschreibung der Kurven	37
4.2.3.	Diskussion der Kurven	40
4.2.4.	Plateaubildung	41
4.2.5.	Erklärung der Zeit - Überlebensrate - Beziehung	42
4.2.6.	Überlegungen zum Mechanismus, welcher der Zeit-Konzentrations-Überlebensrate- -Beziehung zugrunde liegt.	44
4.2.7.	Konzentration - Überlebensrate - Be- ziehung	46
4.2.8.	Die mathematische Form der Dosis- effektbeziehung	47
4.2.9.	Schlußbemerkung	48
5.	Zusammenfassung	49
	Literaturverzeichnis	50

1. Einleitung

Zu den klassischen Therapiemöglichkeiten der Neoplasien, nämlich Bestrahlung und Chirurgie, hat sich die Chemotherapie gesellt, die sich in der kurzen Zeit ihres Bestehens bereits einen festen Platz im Behandlungsplan gesichert hat. Die klinischen Indikationsstellungen der Zytostatika sind bezüglich Tumorart und Ausbreitung (TNM-System) detailliert ausgearbeitet. Ebenso sind in empirischen klinischen Studien Kombinationen der onkolytischen Substanzen und Zeitschemata ausgearbeitet worden und werden weiterhin ausgearbeitet, um die Remissionsraten zu erhöhen. Der bereits beträchtlichen Anzahl der Zytostatika kommen laufend neue hinzu. Trotz des bereits reichlichen klinischen Gebrauchs sind genaue Kenntnisse über Wirkungsweise und den Einfluß des Zeitfaktors in der Applikation auf die Wirksamkeit eher spärlich und zum Teil auch widersprüchlich.

Eines der ältesten Zytostatika ist Vinblastin, welches aus der Reihe der Vincaalkaloide, einem Gesamtextrakt aus *Vinca rosea* Linn., isoliert wurde. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Dosis - Einwirkungsdauer - Überlebensraten Korrelationen an Zellkulturen zu untersuchen, um weitere Einsicht in die Wirkungsweise dieser Substanz und Anhaltspunkte für die klinische Dosierung zu gewinnen.

2. Material, Arbeitsweise und Methode

2.1. Material

2.1.1. Zelltyp

Die Versuche wurden mit chinesischen Hamsterzellen, Stamm B-14 (Kurzbezeichnung Hy), durchgeführt. Ihr Genom besteht aus modal 22 Chromosomen, die Verdoppelungszeit beträgt 16 - 18 h. Bei frischer Einsaat verlängert sie sich um ca. 6 h. Für den Fortbestand der Zellkultur ist es erforderlich, daß sie zweimal pro Woche in frisches Medium passagiert wird.

2.1.2. Nährlösung

Sie bestand aus Eagle's Minimal Essential Medium (Fa. Serva Heidelberg) unter Zugabe von 10 % Serum neugeborener Kälber, welches frei von Viren und Mykoplasmen war.

Bestandteile dieser Lösung pro l:

Zusammensetzung	mg/l	Zusammensetzung	mg/l
Eagle's Minimum Essential Medium:			
L-Arginin	105	Cholinchlorid	1
L-Cystin	24	Folsäure	1
L-Glutamin	292	i-Inosit	2
L-Methionin	15	Nicotinamid	1
L-Phenylalanin	32	D-Pantothensäure-	1
L-Thyreonin	48	Ca-Salz	
L-Tryptophan	10	Pyridoxal HCL	1
L-Tyrosin	36	Riboflavin	0,1
L-Valin	46	L-Leucin	52,4
L-Histidin	31	Thiamin HCL	1
L-Isoleucin	52,5		
L-Lysin	58		

weiterhin:

Zusammensetzung	mg/l	Zusammensetzung	mg/l
KCL	400	Neomycinsulfat	100
NaHCO ₃	350	sowie Hank's Salze in der	
NaOH 1n	2 ml	Menge wie in 2.1.3.	

2.1.3. Salzlösung nach Hank

Diese Lösung setzt sich aus Hank's Salzen ad 1000 ml Aqua dest. zusammen.

Hank's Salze:

NaCl	8000	Na ₂ HPO ₄ : 2 H ₂ O	60
MgSO ₄ : 7 H ₂ O	200	KH ₂ PO ₄	60
CaCl ₂ wasserfrei	140	Glucose	1000
Phenolrot	10		

2.1.4. Fixier- und Färbelösung Methylenblau

Sie besteht aus Methylenblau (Merck Darmstadt) gesättigt in 150 ml Äthanol, 500 ml H₂O und 5 ml 1%-KOH Lösung.

2.1.5. Vinblastin

Es wurde in Form des Vinblastinsulfats (Handelsname Velbe^R) der Fa. Eli -Lilly GmbH, Giessen, verwendet, welches in Portionen von 10 mg Trockensubstanz pro Ampulle erhältlich ist. Diese wurde in 10 ml NaCl Lösung (0,14 n) unter sterilen Kautelen gelöst, wobei der für den laufenden Versuch nicht gebrauchte Anteil sofort nach dem Auflösen des Vinblastins portionsweise zu 1 ml bei -18° C tiefgefroren und für weitere Versuche maximal 14 Tage aufbewahrt wurde.

2.1.6. Solution A

Zusammensetzung	mg/ml		mg/ml
NaCl	8330	KCL	400

NaHCO ₃	350	NaHPO ₄ : 2H ₂ O	60
Phenolrot	20	KH ₂ PO ₄	60

ad 1000 ml Aqua dest.

2.1.7. Trypsinlösung

2 g Trypsin in 1000 ml Solution A.

2.2. Arbeitsweise

Alle Versuche wurden unter keimfreien Bedingungen an einer Sterilbank durchgeführt. Durch ein Horizontalgebläse an der Rückwand der Bank entsteht ein keimfreier Laminar Flow. Die Arbeitsfläche der Bank wurde vor dem Arbeiten mit kurzweiligen UV-Strahlen sterilisiert. Ebenso waren alle Arbeitsgeräte (Glaskolben, Reagenzgläser, Pipetten) keimfrei. Abflammen aller Behältnisöffnungen und zugehöriger Verschlüsse war ebenfalls zur Wahrung der Sterilität erforderlich.

2.2.1. Zellpassage

Alle folgenden Arbeitsgänge wurden nach Möglichkeit auf einer beheizten Laborplatte (37° C) durchgeführt. Die verwendeten Medien und Lösungen wurden für die Versuche ebenfalls auf 37° C im Wasserbad vorgewärmt, ebenso Vinblastin. Zur Vorbereitung der Passage in frisches Medium wurde das auf der Zellkultur befindliche alte Medium abgegossen. Daraufhin ließ man 5 Min. lang 5 ml Solution A auf die Zellen einwirken, zu dem Zweck, den am Boden der Vierkantflasche (Schott) befindlichen Zellrasen von zweiwertigen Ionen freizuwaschen, um die volle Wirksamkeit der im nächsten Arbeitsgang verwendeten Trypsinlösung zu gewährleisten.

Solution A wurde abgegossen, der Überstand abgesaugt, und 2 ml der Trypsinlösung auf den Zellrasen gegeben. Nach 7 Min. Dauer waren die Zellen weitgehend abgelöst. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde die Lösung in eine 1 ml-Pipette gesaugt und wieder in die Flasche zurückgeblasen. Dieser Vorgang wurde insgesamt 15 - 20 mal wiederholt. Danach wurde die Zellsuspension 1:10 mit Eagle's Medium verdünnt und die Zellzahl pro ml in der Bürker-Zählkammer ermittelt. Weiterverdünnung, ebenfalls mit Eagle's Medium, erbrachte die für Versuche oder Weiterkultivierung notwendige Zellkonzentration. Bei der einfachen Passage wurden 70 000 und 100 000 Zellen in Vierkantflaschen eingefüllt und unter Zugabe von 9 ml Eagle's Medium in den Brutschrank zur Inkubation bei 37° C gebracht. Darin wurde durch CO₂-Begasung der pH-Wert auf 7,0 geregelt. Die Zellkulturen mußten alle 3 - 4 Tage passagiert werden, da die Anhäufung von Stoffwechselprodukten und saurer Metaboliten die weitere Zellvermehrung beeinträchtigt hätte.

2.3. Methode der Versuchsdurchführung

Die aus der Passage gewonnenen Zellen wurden so verdünnt, daß sich die für die Einsaat gewünschte Zellzahl jeweils in 1 ml Lösung befand.

Das in physiologischer NaCl-Lösung befindliche Vinblastin (Konz. 1 mg/ml) wurde mit Hank's Medium auf die erforderliche Konzentration gebracht.

Zur Bestimmung eines Versuchswertes wurden immer vier Flaschen angesetzt. Dabei wurde zuerst 1 ml des entsprechend konzentrierten Vinblastins, dann 8 ml Eagle's Medium und erst zuletzt, um Verunreinigung der Medien mit Vinblastin zu vermeiden, 1 ml Zellsuspension eingefüllt. Es befanden sich also 10 ml in jeder Flasche.

Diese wurden mit Staniolfolie verschlossen und im Brutschrank für die zur Versuchsdurchführung erforderliche Zeit inkubiert. Nach Ablauf dieser Frist wurde Vinblastin aus den Zellen ausgewaschen. Darauf wurden sie mit 10 ml frischem Eagle's Medium im Brutschrank inkubiert.

2.3.1. Plating Efficiency

Da die Zellen auch ohne Einwirkung von Vinblastin im Brutschrank spontan absterben, ist es erforderlich, einen Standardwert, nämlich die Plating Efficiency (Abk. PE), anzusetzen, der angibt, wieviele Zellen in einer Flasche überleben. Dazu wurden ebenfalls in vier Flaschen je 200 Zellen und 9 ml Eagle's Medium eingefüllt.

Der Spülvorgang bei den mit Vinblastin behandelten Flaschen ist mit mechanischer Entfernung einiger Zellen verknüpft. Um diesen Effekt zu kompensieren, wird auch die PE nach dem gleichen Zeitintervall wie die vinblastinhaltigen Flaschen auf die gleiche Weise wie diese gespült. Nach Zugabe von 10 ml frischem Eagle's Medium wurde diese ebenso wie die Versuchsserie im Brutschrank weiterinkubiert.

Diese und die Kontrolle wurden insgesamt 7 Tage bebrütet, wodurch aus jeder anfangs eingesäten, teilungsfähigen Zelle ein Zellhaufen (=Kolonie) entstand.

Bei der Versuchsauswertung entspricht jede Kolonie einer ursprünglich eingesäten, überlebenden Zelle.

2.3.2. Versuchsauszählung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Flaschen aus dem Brutschrank genommen, das Überstehende Medium nach Abkühlung abgegossen und die Kolonien mit Methylenblaulösung fixiert und gefärbt. Bei noch warmen Flaschen besteht die Gefahr der Ablösung der Kolonien vom Boden

während des Färbevorgangs. Nach Anfärbung wurden die Kolonien, die aus mehr als 50 Einzelzellen bestanden, im Stereomikroskop ausgezählt. Bei längeren Einwirkzeiten des Zytostatikums (37h, 48h, 75h) erreichen die Kolonien nicht die Größe und Dichte wie bei den kürzeren Zeiten.

2.3.3. Systematik der Vorversuche

2.3.3.1. Spülversuche

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, die Zusammenhänge zwischen der Vinblastinkonzentration, dessen Einwirkungszeit und der Überlebensrate der chinesischen Hamsterzellen zu ermitteln. In Vorversuchen, die hier nicht beschrieben sind, wurde einerseits die notwendige Routine für die Hauptversuche erarbeitet, andererseits wurden die Grenzen in Konzentration und Zeit für die Vinblastineinwirkung in Relation zur notwendigen Zeiteinsaat ausfindig gemacht. Die Ergebnisse dieser Versuche schwankten erheblich, da, wie sich erst später herausstellte, der Spülvorgang als solcher eine bedeutende Rolle spielte. Dies lag daran, daß Vinblastin selbst in geringsten Konzentrationen (niedrigste getestete Dosis 0,01 µg/ml) noch zytotoxische Wirkungen ausübt, wenn es nur lang genug einwirken kann, und geringste Reste von Vinblastin nach dem Spülvorgang im Medium die Ausbildung von Kolonien entweder störten oder vollständig verhinderten. Aus diesem Grund wurden verschiedene Spültechniken in wiederholten Versuchen in ihrer Auswirkung auf die Überlebensrate und geringste Streuung der Koloniesausbeute (entsprechend niedrigster Standardabweichung) untersucht. Die hierbei verwendete Einsaat pro Flasche waren 500 Zellen bei 10 µg/ml Vinblastinkonzentration (in den Tabellen abgekürzt als: 500/10 µg/ml) und 5 µg/ml Vinblastin.

Die einzelnen Spülarten waren:

- A Absaugen des vinblastinhaltigen Mediums; dann Zugabe von 5 ml Hank's Lösung; vorsichtiges Schwenken der Flasche durch eine Handdrehbewegung so, daß der Zellrasen einmal von dieser Lösung überflutet wurde; danach Absaugen der Lösung und Beschickung der Flasche mit frischem Eagle's Medium.
- B Wie A, aber zweimalige Spülung mit Hank's Lösung.
- C Wie A, aber dreimalige Spülung mit Hank's Lösung.
- D Wie A, aber viermalige Spülung mit Hank's Lösung.
- E Absaugen der vinblastinhaltigen Lösung; Zugabe von 10 ml Hank's Lösung, die 10 Minuten auf dem Zellrasen belassen wurde; nach diesem Zeitintervall Absaugen der Lösung; nach 1 Minute nochmaliges Absaugen des zusammengelaufenen Rückstandes.
- F Ähnlich E, nur Zugabe von 5 ml Hank's Lösung; Einwirkdauer 5 Min.; Absaugen der Lösung; Wiederholung dieses Vorgangs; weiterhin nach 1 Min. nochmaliges Absaugen des zusammengelaufenen Rückstandes.
- G Spülung wie unter C; nach 1 Min. Absaugen des zusammengelaufenen Rückstandes .

Unter allen Methoden hat sich, wie aus nachfolgender Tabelle ersichtlich, die Spülart G als die günstigste erwiesen. Sie wurde bei allen Versuchen beibehalten und auch bei der PE durchgeführt.

Um den mechanischen Abrieb während des Spülvorgangs zu untersuchen, wurde einmal die PE nicht mit Hank's-, sondern mit Eagle's Medium gespült. Die abgesaugte Spülflüssigkeit wurde dabei wieder in vier Flaschen eingefüllt und wie die PE weiter inkubiert, um zu sehen, ob sich nach Bebrütung dieser Flaschen Kolonien finden.

Tatsächlich befanden sich in vier Flaschen insgesamt 37 Kolonien. In den vier PE's befanden sich zusammen 648 Kolonien. Da sich die 37 Kolonien vor der Spülung in der PE befanden, beträgt der Anteil der während der Spülung abgedrifteten Zellen $\frac{37}{648 + 37} = \frac{37}{685} = 0,054$, also etwa 5 %. Dieser Effekt findet sowohl in der Kontrolle, als auch in den behandelten Kulturen statt und hebt sich daher in der Berechnung der Überlebensrate auf.

Tabelle I Spüleffekt

Datum								
Zellpas- sage Nr.							Stand- ardab- weich- ung	Über- lebens- rate Ü
Einsaat/ Konz.	Spül- art	Kolonieausbeute					Durch- schnitt	
28.11.77	A	0	0	0	0	0	0	0
Hy 111	B	79	250	-	239	189,33	78,14	37,2
500/5µg/ml	C	252	333	278	269	283	30,33	55,6
	PE	216	184	206	208	203,5		
15.12.77	A	0	0	0	0	0	0	0
Hy 45	B	132	72	71	46	80,25	31,64	32,7
500/5µg/ml	C	119	145	177	169	152,5	22,64	62,04
500/10µg/ml	B	20	2	-	-	5,5		
	PE	106	96	92	-			
1.12.78	B	0	0	0	0	0	0	0
Hy 41	PE	196	210	198	210	203,5		
500/10µg/ml								
2. 1.78	G	189	191	212	209	200,25	10,32	69,35
Hy 50	D	202	186	192	164	186	13,9	64,4
500/5µg/ml	E	182	195	206	196	194,75	8,52	67,44
	F	168	148	159	155	166,5	11,14	57,66
	PE	114	117	124	107	115,5		

Wie aus Tabelle I ersichtlich, hat Spülart G die größte Überlebensrate bei geringer Streuung. Auffällig ist das Ergebnis bei Spülart E, die etwa gleich günstig ist, obwohl nur ein Mal das Spülmedium hinzugegeben wird. Für den weiteren Ablauf der Arbeit wurde immer Spülart G verwendet, da ihr zeitlicher Rhythmus aus arbeitstechnischen Gründen vorteilhafter war als Spülart E.

2.3.3.2. Aktivitätstestung

Wie bereits erwähnt, konnte das aus einer Trockenampulle aufgelöste Vinblastin in einem einzigen Versuchsansatz nicht aufgebraucht werden und mußte daher bei -18° C aufbewahrt werden. Der pharmakologische Prospekt der Firma Eli-Lilly (41) gibt an, daß Vinblastin 30 Tage ohne Wirkungsverlust im Kühlschrank aufbewahrt werden kann. Dies wurde für vorliegende Arbeit nochmals überprüft, um sicher zu gehen, daß sich durch die Verwendung des eingefrorenen Vinblastins keine Fehler einschleichen. Dazu wurde jeweils frisches und tiefgefrorenes Vinblastin in Bezug auf seine Auswirkung auf die Überlebensrate unter sonst identischen Bedingungen getestet und verglichen. Das tiefgefrorene Vinblastin hierzu war je nach Versuch 14, 21 und 28 Tage eingefroren. Längere Zeitintervalle wurden nicht untersucht, da während der ganzen experimentellen Arbeit nie Vinblastin zur Verwendung kam, welches länger als 3 Wochen eingefroren war. Aus nachfolgender Tabelle sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe dargestellt.

Tabelle II Aktivitätstestung

Bei allen Versuchen Vinblastinexpositionszeit 4 h

Datum								
Zellpas- sage Nr.	Ge- frier- dauer (Tage)	Kolonieausbeute			Durch schnitt x	Stand- ardab- weich- ung s	Über- lebens- rate Ü	
Einsaat/ Konz.								

5. 1.78

Hy 51

200/ 5µg/ml	14	82	116	70	103	92,75	17,87	82,8
200/10µg/ml	14	25	46	27	-	32,66	9,46	29
200/ 5µg/ml	0	86	84	91	88	87,25	2,58	77,9
200/10µg/ml	0	41	-	37	27	35	5,88	31,2
PE		100	120	110	118	112		

19. 1.78

Hy 55

200/ 5µg/ml	21	77	82	67	47	68,25	13,40	55,2
200/10µg/ml	21	53	45	54	35	46,75	7,62	38
200/ 5µg/ml	14	86	53	73	80	73	12,42	59
200/10µg/ml	14	47	51	60	42	50	6,59	40
200/ 5µg/ml	0	81	81	60	67	72,25	9,09	58,5
200/10µg/ml	0	57	66	46	38	51,75	10,63	41
PE		138	113	116	127	123,5		

26. 1.78

Hy 57

200/ 5µg/ml	21	66	64	60	59	62,25	2,86	76,3
200/10µg/ml	21	44	35	36	-	38,6	4,02	47,36
200/ 5µg/ml	0	59	42	52	64	56,75	8,25	69

Datum								
Zellpas- sage Nr.	Ge- frier- dauer (Tage)	Kolonieausbeute				Durch- schnitt x	Stand- ardab- weich- ung s	Über- lebens- rate Ü
200/10µg/ml	0	50	57	36	43	46,5	7,82	56
PE		79	87	84	76	81,5		

3. 2.78

Hy 59

200/ 5µg/ml	28	107	106	118	142	118,25	14,49	80
200/10µg/ml	28	52	62	84	83	70,75	13,71	58,1
200/ 5µg/ml	0	146	128	91	118	120,75	19,89	81
200/10µg/ml	0	45	90	108	91	83,5	23,35	56
PE		164	154	129	155	150,5		

Zusammenfassend ist festzustellen, daß auch nach 28 Tagen kein Wirkungsverlust feststellbar ist. Die nach unten sowohl wie nach oben geringfügigen Abweichungen liegen innerhalb der statistischen Streuung und sind daher nicht für einen Unterschied in der Überlebensrate beweisend.

2.3.3.3. Inaktivierung

Als letztes in der Reihe der Vorversuche galt es zu untersuchen, ob Vinblastin während der Inkubationszeit selbst unter Versuchsbedingungen, das heißt bei 37° C, pH=7,0 sowie in den verwendeten Medien, einen Wirkungsverlust erleidet. Die Vinblastininkubationszeiten variierten bei den Hauptversuchen zwischen 4 und 75 Stunden. Prinzipiell wurde dabei wie schon beim Spülversuch vorgegangen. Ebenso wie dort wurde ermittelt, ob ein Unterschied zwischen frisch angesetzttem Vinblastin und sol-

chem, welches bereits einige Zeit im Brutschrank aufbewahrt war, in Bezug auf die Überlebensrate bei gleichen Einsaatbedingungen besteht. Vinblastin wurde mit Hank's Lösung auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt und für die in Tabelle III angegebenen Zeiten im Brutschrank bei 37° C und pH = 7,0 in einem sterilen Glasbehälter inkubiert. Nach Ablauf dieser Frist wurde dieses Vinblastin auf die für die Versuche notwendige Konzentration weiterherabverdünnt, mit Hamsterzellen und Medium in Flaschen eingesät und daraufhin für 4 bzw. 8 h inkubiert und mit frisch angesetzttem Vinblastin verglichen. In Tabelle III sind die Ergebnisse dieser Versuchsserie aufgeführt.

Tabelle III Inaktivierung

Datum									
Zellpas- sage Nr.	Vinbl. Vorinku- bations- zeit (h)	Kolonieausbeute					Durch- schnitt x	Stand- ardab- weich- ung s	Über- lebens- rate Ü
Einsaat/ Konz.									
29.12.77 4h Inkubation									
Hy 49									
200/0,5µg/ml	0	113	125	108	128	118,5	8,26	75	
200/2,0µg/ml	0	73	74	82	88	79,25	6,14	50,8	
200/0,5µg/ml	48	155	112	116	109	123	18,64	78	
200/2,0µg/ml	48	67	91	80	86	81	8,97	51,92	
PE		155	162	150	157	156			

26. 1.78 4h Inkubation

Hy 57

200/ 5µg/ml	0	59	42	52	64	56,75	8,25	69	
200/10µg/ml	0	57	36	43	50	46,5	7,82	56	
200/ 5µg/ml	48	48	60	59	55	55,5	4,71	68	

Datum	Vinbl.						Stand-	Über-
Zellpas-	Vorinku-						ardab-	lebens-
sage Nr.	bations-						weich-	rate
Einsaat/	zeit	Kolonieausbeute					ung	Ü
Konz.	(h)						s	
200/10µg/ml	48	50	43	61	41	48,75	7,82	60
PE		79	87	84	76	81,5		

16. 3.78 4h Inkubation

Hy 72

200/ 1µg/ml	0	50	42	43	46	45,25	3,11	20
200/10µg/ml	0	56	57	57	57	56,75	0,43	10
200/ 1µg/ml	72	42	53	49	49	48,25	3,96	21,25
500/10µg/ml	72	71	53	54	43	55,25	10,05	9,7
PE		241	234	208	225	227		

28. 4.78 8h Inkubation

Hy 83

200/ 5µg/ml	0	122	108	111	108	112,25	5,76	69,29
200/10µg/ml	0	102	96	104	88	97,5	6,22	60,18
200/ 5µg/ml	72	120	118	91	100	107,25	12,19	66,62
200/10µg/ml	72	85	97	112	72	91,5	14,77	56,5
PE		126	163	181	178	162		

Vinblastin befand sich insgesamt maximal 80 Stunden im Brutschrank (72 h Vorinkubation und 8 h Versuchsdauer). Auch nach dieser Zeit ist kein Wirkungsverlust gegenüber frisch angesetzttem Vinblastin erkennbar.

2.4. Methode der Hauptversuche

2.4.1. Bestimmung der Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbeziehung

Während in den Vorversuchen mögliche systemische Fehler ausgeschlossen wurden, bestand der Zweck nachfolgender Experimente darin, die Beziehung zwischen Vinblastineinwirkungsdauer und Konzentration hinsichtlich der zytostatischen Wirkung zu ermitteln.

Wie bereits erwähnt, lagen die Inkubationszeiten zwischen 4 und 75 h. Dabei wurde so vorgegangen, daß die verschiedenen Konzentrationen, die sich zwischen 0,01 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$ bewegten, in jeweils einem Versuch für ein festes Inkubationszeitintervall untersucht wurden. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß alle Flaschen auf einmal gespült werden können. Der Nachteil hingegen liegt darin, daß Vinblastinverdünnungsreihen erstellt werden, was naturgemäß mit Fehlern beim Pipettieren verbunden ist, obwohl versucht wurde, diese durch möglichst genaues Arbeiten so klein wie nur möglich zu halten. Die Alternative, eine Konzentration des Vinblastins für verschiedene Inkubationszeiten in einem Versuch zusammenzustellen, vermeidet zwar Verdünnungsfehler beim Vinblastin, erfordert aber verschieden hohe Zelleinsaaten für die verschiedenen Zeiten, was wiederum zur Streuung der Ergebnisse führt. Bei dem verwendeten Verfahren konnte die Zelleinsaat pro Versuchsansatz fast immer konstant gehalten werden. Außerdem hat das zuletzt erwähnte Verfahren den Nachteil, daß man durch die Auffolge der zu untersuchenden Zeiten terminlich stark gebunden ist, da der Einsatz der Spülung auf die Minute genau einzuhalten ist. Soweit diese Bedingung durch äußere Umstände nicht eingehalten werden konnte, sind die Ergebnisse jener Versuche dieser Arbeit nicht aufgeführt. Um die statistische Streuung der Werte möglichst in Grenzen zu halten, wurden die Experimente mehrfach wiederholt.

2.4.2. Bestimmung der Mitoseverteilung bei den verschiedenen Vinblastinkonzentrationen

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Hauptversuche und der graphischen Darstellung derselben fällt eine Diskrepanz in der Steigung der verschiedenen Kurven für die verschiedenen Vinblastinkonzentrationen auf. Dieser Sprung, besonders bei langen Inkubationsdauern zwischen $0,01 \mu\text{g/ml}$ und den höheren Konzentrationen, ließ sich nicht erklären. Um dieses Phänomen näher zu beleuchten, wurde folgender Versuch durchgeführt:

In 4 Flaschen wurden je 5000 Zellen und Vinblastin in den Konzentrationen $0,01 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$, $1,0 \mu\text{g/ml}$ und $10 \mu\text{g/ml}$ eingefüllt. Die Flaschen wurden dann 48 h bebrütet. In dieser Zeit können die Hamsterzellen, wenn sie nicht in der Mitose arretiert werden, mindestens zwei Zellzyklen durchlaufen. Um zu sehen wie viele Zellteilungen bei den verschiedenen Konzentrationen stattgefunden haben, wurden die Flaschen nach der Inkubationszeit ungefärbt direkt im Stereomikroskop betrachtet und die Anzahl der einzelnen Zellen pro Mikrokolonie gezählt. Weiterhin wurde auf die Zellform geachtet. Die in der Mitose arretierten Hamsterzellen sind rund, die proliferierenden Interphasezellen spindelförmig.

3. Hauptversuche

3.1. Ergebnisse der Zeit-Überlebensrate-Konzentrations-Beziehung

In der nachfolgenden Tabelle IV sind die Ergebnisse der Hauptversuche aufgeführt. Die Tabelle IV ist nicht chronologisch angeordnet; vielmehr sind immer die verschiedenen Untersuchungen einer Konzentration bei einem

Inkubationsintervall in einem Absatz aufgeführt. Diese beiden Parameter stehen jeweils als Überschrift über den Absätzen. In der ersten Spalte ist die Höhe der Einsaat angegeben, in der zweiten die Zellpassagenummer. In Spalte Nr. 3 folgt das Datum. In Spalte Nr. 4 folgt die zu dem Versuch gehörige PE, welche als arithmetisches Mittel der in den vier für die Plating Efficiency angesetzten Flaschen ausgezählten Kolonien errechnet und in Prozent angegeben ist (entsprechend 200 Kolonien = 100 %). Um die Ergebnisse der einzelnen Versuche vergleichen zu können, ist in Spalte 5 die Koloniausbeute jeder behandelten Flasche als Prozentsatz der Kontrolle angegeben, wobei er auf den Mittelwert der zugehörigen PE bezogen und auf 100 % normiert ist. In Spalte 6 ist der Mittelwert der Ergebnisse der Koloniausbeute aufgeführt. In Spalte 7 folgt der Gesamtdurchschnitt der Überlebensraten aus allen Werten der mit der jeweiligen Konzentration behandelten Flaschen. Weiterhin findet man in Spalte 8 die Standardabweichung aller für eine Konzentration ermittelten Einzelwerte. Da jedoch die Mittelwerte verschieden sind, kann man mit der Standardabweichung die Streuung der Ergebnisse für die verschiedenen Konzentrationen nicht vergleichen. Um dies zu ermöglichen, ist in Spalte 9 der χ^2 -Wert angegeben. Er setzt die Summe der quadratischen Abweichungen vom Mittelwert in Relation zu dessen Höhe und erlaubt somit einen Vergleich der Streubreite der einzelnen Versuchsgruppen.

$$\chi^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{\bar{x}} ;$$

Im Anschluß an die Tabelle für die Hauptversuche folgen die graphischen Darstellungen der Überlebensrate in Abhängigkeit von der Zeit (Abb. 1, S.28) und von der Konzentration (Abb. 2, S.29).

Ein- saat	Zell- pas- sage Nr.	Datum	PE %	Kolonieausbeute	Mittel- wert x = $\bar{x}$	Gesamt- durch- schnitt X	Stand- ardab- weich- ung s	chi ²
				4h 0,5µg/ml				
1000	Hy 49	29.12.77	71,0	72,4 80,1 69,2 82,0	75,9	75,9	6,10	1,47
				4h 1,0µg/ml				
500	Hy 47	22.12.77	76,0	45,0 73,1 74,5 51,3	60,8			
200	Hy 57	26. 1.78	41,0	75,6 87,8 80,5 68,3	78,0	67,9	11,62	20,50
500	Hy 49	27.12.77	75,0	73,8 61,0 61,9 63,7	65,0			
				4h 5,0µg/ml				
500	Hy 45	15.12.77	49,0	48,6 59,1 72,2 70,0	62,0			
200	Hy 51	5. 1.78	56,0	76,8 75,0 81,0 78,6	77,9			
200	Hy 57	26. 1.78	41,0	72,0 63,0 63,0 78,0	69,0	65,6	11,8	31,36
200	Hy 55	19. 1.78	61,8	65,6 48,3 41,3 54,2	58,5			

Ein- saat	Zell- pas- sage Nr.	Datum	PE %	Kolonieausbeute %	Mittel- wert x = $\bar{x}$	Gesamt- durch- schnitt x	Stand- ardab- weich- ung s	chi ²
				4h 10 μ g/ml				
200	Hy 51	5. 1.78	56,0	36,6 - 33,0 24,1	31,25			
200	Hy 55	19. 1.78	61,8	46,2 53,4 37,2 30,8	41,9			
200	Hy 57	26. 1.78	41,0	61,0 69,0 43,9 52,4	56,7	47,4	14,78	64,30
200	Hy 59	3. 2.78	74,3	30,3 60,6 72,7 61,2	56,2			
				4h 20 μ g/ml				
200	Hy 59	3. 2.78	74,3	25,5 - 33,6 29,8	29,5			
200	Hy 57	26. 1.78	41,0	36,8 56,3 22,1 -	38,4	33,9	11,09	18,08
				8h 0,01 μ g/ml				
200	Hy 58	30. 1.78	66,0	84,1 69,6 69,0 82,5	76,5			
200	Hy 77	7. 4.78	127,8	77,5 75,2 91,6 77,1	80,6	83,4	11,52	17,43
200	Hy 83	28. 4.78	81,0	96,3 98,2 74,0 96,6	93,6			

Ein- saat	Zell- pas- sage Nr.	Datum	PE %	Kolonieausbeute %	Mittel- wert x = $\bar{x}$	Gesamt- durch- schnitt X	Stand- ardab- weich- ung s	chi ²
				8h 0,1µg/ml				
500	HY 49	29.12.77	48,0	60,2 58,2 54,1 58,5				
200	HY 48	30. 1.78	66,0	62,1 76,5 78,5 72,5	71,2	67,1	7,59	9,46
200	HY 83	28. 4.78	81,0	71,3 74,0 69,5 75,4	72,5			
				8h 1,0µg/ml				
500	HY 49	27.12.77	75,0	52,1 69,3 58,3 53,7	55,8			
200	HY 58	30. 1.78	60,0	75,1 61,9 54,4 67,3	60,0	63,20	7,87	10,79
200	HY 77	7. 4.78	127,8	71,2 70,1 75,9 69,3	71,6			
				8h 5,0µg/ml				
200	HY 58	30. 1.78	60,0	45,4 39,4 52,2 43,2	45,0			
200	HY 77	7. 4.78	127,8	69,0 68,5 71,2 59,5	67,0	58,3	11,52	24,91
200	HY 83	28. 4.78	81,0	72,0 71,3 50,4 57,8	62,9			

Ein- saat	Zell- pas- sage Nr.	Datum	PE %	Kolonieausbeute %	Mittel- wert x = $\bar{x}$	Gesamt- durch- schnitt X	Stand- ardab- weich- ung s	chi ²
				8h 10 μ g/ml				
200	Hy 58	30. 1.77	66,0	38,8 31,0 35,0 27,0	31,2			
200	Hy 77	7. 4.78	127,8	65,7 48,1 45,0 46,2	51,3	46,1	11,08	29,27
200	Hy 83	28. 4.78	81,0	59,0 54,6 54,6 48,5	54,2			
				8h 20 μ g/ml				
200	Hy 58	30. 1.78	66,0	29,5 21,2 18,9 37,8	25,9			
200	Hy 77	7. 4.78	127,8	15,7 19,0 20,6 15,7	17,5	23,5	8,36	32,66
200	Hy 83	28. 4.78	81,0	42,0 25,9 21,0 15,4	26,1			
				16h 0,01 μ g/ml				
200	Hy 62	14. 2.78	100,0	40,2 40,2 45,1 42,6	42,8			
200	Hy 72	16. 3.78	113,5	29,1 37,0 34,0 41,8	35,5	38,5	4,67	4,13

Ein- saat	Zell- pas- sage Nr.	Datum	PE %	Kolonieausbeute %	Mittel- wert $\bar{x} = \bar{u}$	Gesamt- durch- schnitt $\bar{X}$	Stand- ardab- weich- ung s	chi ²
				16h 0,1µg/ml				
1000	Hy 49	29.12.77	71,0	19,3 17,5 19,2 20,7	19,7			
200	Hy 55	19. 1.78	49,0	29,5 26,5 24,5 20,4	29,0			
200	Hy 62	14. 2.78	100,0	37,3 38,5 36,2 37,8	38,0	27,9	7,85	32,90
200	Hy 72	16. 3.78	113,5	21,1 26,4 27,8 24,2	24,9			
				16h 1,0µg/ml				
2000	Hy 49	29.12.77	71,0	20,8 20,3 18,5 19,7	19,8			
200	Hy 55	19. 1.78	49,0	16,2 16,2 23,5 16,2	18,5			
200	Hy 62	14. 2.78	100,0	39,0 39,0 30,5 33,0	32,9	22,6	7,47	36,45
200	Hy 72	16. 3.78	113,5	22,0 18,5 18,9 20,3	19,3			
				16h 5,0µg/ml				
5000	Hy 49	29.12.77	71,0	16,3 16,9 17,4 17,6	17,1			
200	Hy 55	19. 1.78	49,0	20,2 17,1 18,2 20,2	19,2	18,2	1,66	1,05

Ein- saat	Zell- pas- sage Nr.	Datum	PE %	Kolonieausbeute %	Mittel- wert x = $\bar{u}$	Gesamt- durch- schnitt X	Stand- ardab- weich- ung s	chi ²
				16h 10µg/ml				
10.000	Hy 49	29.12.78	71,0	7,2 5,1 5,2 6,8	6,1			
500	Hy 55	19. 1.78	49,0	6,0 6,5 6,9 6,5	6,5			
500	Hy 62	14. 2.78	100,0	12,5 16,4 15,8 15,8	14,7	9,28	3,74	22,62
500	Hy 72	16. 3.78	113,5	9,6 10,0 10,0 10,0	9,9			
				16h 20µg/ml				
1000	Hy 55	19. 1.78	49,0	5,7 1,8 3,0 2,6	3,3			
1000	Hy 62	14. 2.78	100,0	9,2 6,4 7,5 8,8	7,5	5,3	2,22	10,23
1000	Hy 72	16. 3.78	113,5	5,4 5,0 4,4 5,4	5,1			
				24h 0,01µg/ml				
200	Hy 71	14. 3.78	67,6	44,4 31,0 57,0 40,0 43,0		43,0	9,36	6,12

Ein- saat	Zell- pas- sage Nr.	Datum	PE %	Kolonieausbeute %	Mittel- wert. x = $\bar{x}$	Gesamt- durch- schnitt X	Stand- ardab- weich- ung s	chi ²
				24h 0,1µg/ml				
1000	Hy 49	29.12.77	71,0	26,0 25,0 29,2 -	26,8			
200	Hy 56	23. 1.78	78,3	19,2 15,3 16,6 18,5	17,4	25,6	7,05	19,40
200	Hy 71	14. 3.78	67,6	34,7 26,6 33,3 35,2	32,7			
				24,h 1,0µg/ml				
2000	Hy 49	27.12.77	76,0	11,8 15,3 12,2 12,5	12,8			
200	Hy 56	23. 1.78	78,3	10,2 10,2 12,1 12,8	11,3	14,1	5,01	17,47
200	Hy 71	14. 3.78	67,6	16,3 14,8 17,7 24,4	18,3			
				24h 5,0µg/ml				
5000	Hy 49	30.12.77	74,0	5,4 5,1 6,3 6,1	5,8			
500	Hy 56	23. 1.78	78,3	10,5 11,2 12,8 11,5	11,5	10,4	4,06	17,37
500	Hy 71	14. 3.78	67,6	18,0 10,9 16,8 12,1	14,0			

Ein- saat	Zell- pas- sage Nr.	Datum	PE %	Kolonieausbeute %	Mittel- wert x = $\bar{x}$	Gesamt- durch- schnitt X	Stand- ardab- weich- ung s	chi ²
				24h 10µg/ml				
10.000	HY 49	30.12.77	74,0	2,1 2,0 3,2 2,3	2,4			
500	HY 56	23. 1.78	78,3	4,8 6,1 5,6 4,6	5,3	5,13	2,22	10,65
500	HY 71	14. 3.78	67,6	7,7 8,5 6,8 7,7	7,7			
				24h 20µg/ml				
1000	HY 78	11. 4.78	72,4	4,4 1,6 2,7 2,7	2,9			
1000	HY 78	11. 4.78	46,0	3,6 2,3 3,0 1,3	2,6	2,42	0,87	3,73
1000	HY 82	25. 4.78	115,8	1,5 1,9 2,0 2,1	1,9			
				37h 0,01µg/ml				
200	HY 78	11. 4.78	72,4	33,9 42,1 37,3 28,3	35,3			
200	HY 82	25. 4.78	57,9	32,0 23,3 41,5 26,8	30,9	33,15	6,42	8,70

Ein- saat	Zell- pas- sage Nr.	Datum	PE %	Kolonieausbeute %	Mittel- wert $\bar{x} = \bar{u}$	Gesamt- durch- schnitt $\bar{X}$	Stand- ardab- weich- ung s	χ^2
				37h 0,1µg/ml				
1000	HY 72 16.	3.78	113,5	1,80 2,20 1,46 1,70	1,80			
1000	HY 78 11.	4.78	72,4	7,05 7,05 7,50 5,00	6,65	4,50	2,17	11,47
1000	HY 82 25.	4.78	57,9	5,70 4,50 4,00 5,87	5,01			
				37h 1,0µg/ml				
5000	HY 72 16.	3.78	113,5	1,50 1,60 1,60 1,18	1,50			
1000	HY 78 11.	4.78	72,4	5,00 4,83 5,66 5,80	5,32	3,79	1,74	8,75
1000	HY 82 25.	4.78	57,9	4,00 4,00 4,66 5,70	5,50			
				37h 5,0µg/ml				
5000	HY 72 16.	3.78	113,5	1,19 0,75 0,75 0,86	0,89			
5000	HY 78 11.	4.78	72,4	2,12 1,82 2,23 2,04	2,05	1,83	0,73	3,23
5000	HY 82 25.	4.78	57,9	3,00 2,20 2,70 2,30	2,55			

Ein- saat	Zell- pas- sage Nr.	Datum	PE %	Kolonieausbeute %	Mittel- wert x = $\bar{x}$	Gesamt- durch- schnitt X	Stand- ardab- weich- ung s	chi ²
				48h 0,01µg/ml				
500	Hy 60	7. 2.78	123,5	40,0 43,0 38,9 34,7	39,0			
200	Hy 67	1. 3.78	51,8	20,2 19,2 27,9 26,7	23,6	28,53	8,36	26,96
200	Hy 69	7. 3.78	87,0	18,4 23,5 29,8 20,6	23,0			
				48h 0,1µg/ml				
1000	Hy 60	7. 2.78	23,5	0,72 0,56 0,56 0,48	0,59			
1000	Hy 67	1. 3.78	51,8	0,58 0,58 0,77 1,10	0,77	0,90	0,42	2,16
1000	Hy 69	7. 3.78	87,0	1,00 1,30 1,37 1,72	1,34			
				48h 1,0µg/ml				
2000	Hy 60	7. 2.78	123,5	0,52 0,36 0,36 0,32	0,39			
5000	Hy 67	1. 3.78	51,8	0,77 0,85 0,69 0,58	0,72	0,53	0,16	0,52
5000	Hy 69	7. 3.78	87,0	0,50 0,46 0,55 0,44	0,49			
				75h 0,01µg/ml				
500	Hy 69	7. 3.78	87,0	13,5 8,9 5,2 9,9	9,4	9,4	2,96	2,79

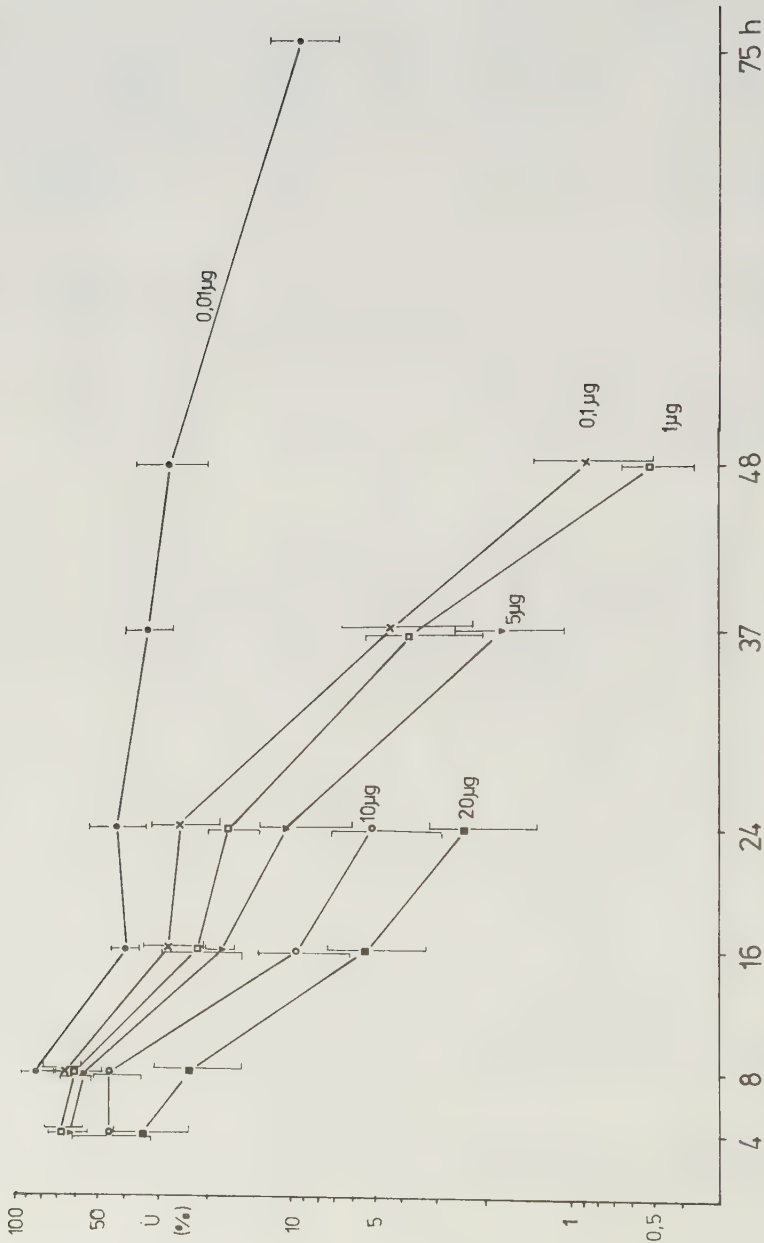
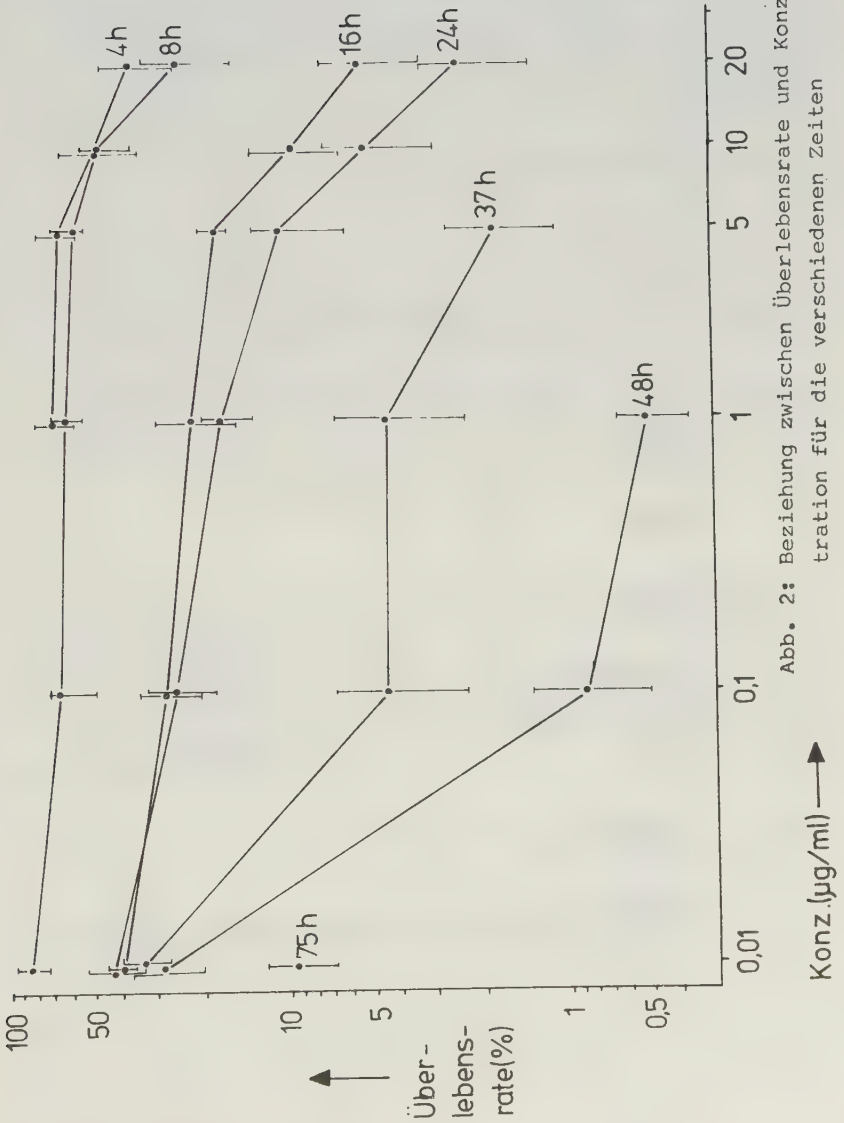


Abb. 1: Beziehung zwischen Überlebensrate (Ü) und Einwirkungsdauer für die verschiedenen Vinblastinkonzentrationen (µg/ml)



3.2. Ergebnis der Mitoseverteilung bei den verschiedenen Vinblastinkonzentrationen

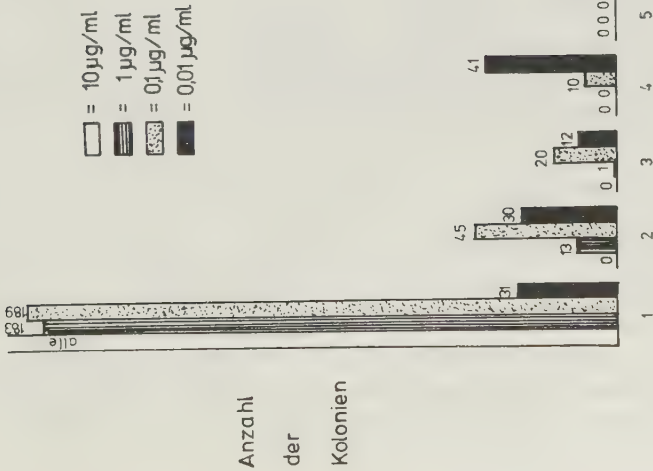
Die Ergebnisse des in 2.4.2. beschriebenen Versuchs sind in Tabelle V aufgeführt und in Abb. 3, S.31 graphisch dargestellt.

Tabelle V Mitoseverteilung

Hy 79 12. 5.78

Konzentration	Anzahl der Kolonien	Koloniegrößenverteilung (Häufigkeit x Zellzahl)	Form
0,01 μ g/ml für 48h	212	31x 1, 30x 2, 12x 3, 41x 4 21x 5, 23x 6, 23x 7, 13x 8 1x 9, 4x10, 1x11, 3x12 1x14, 1x15, 1x16, 1x19 1x22	nur spindelförmige Zellen
0,1 μ g/ml für 48h	160	189x 1, 45x 2, 20x 3, 10x 4	runde und spindelförmige Zellen
1,0 μ g/ml für 48h	199	183x 1, 13x 2, 1x 3	fast nur runde Zellen
10 μ g/ml für 48h		nur vereinzelte Zellen	nur runde Zellen

Abb. 3.: Verteilungsmuster der Zellzahl pro Mikrokolonie bei 48h Expositionszeit mit verschiedenen Vinblastinkonzentrationen. Über den Balken ist die Anzahl der Kolonien in der jeweiligen Klasse angegeben.



Anzahl der Zellen pro Kolonie

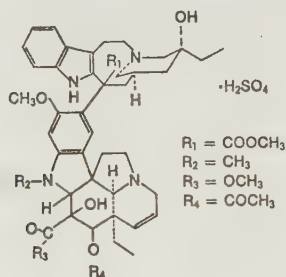
4. Diskussion

4.1. Allgemeines zur Wirkung von Vinblastin

4.1.1. Struktur des Vinblastins

Das Vincaalkaloid Vinblastin besteht in seiner Grundstruktur aus einem Indol- und einem Dihydroindolring, die in komplexer Weise mit der Catharanthinstruktur verbunden sind (6). Änderungen an den Seitenketten führen zu einem weiteren bekannten Vertreter der Vincaalkaloide, Vincristin und noch zu weiteren klinisch nicht angewandten Verbindungen. Die Summenformel lautet $C_{46} H_{58} O_9 N_4$ (29), das Molekulargewicht beträgt 810 (20). 1 μ g Vinblastin entspricht somit $1,23 \times 10^{-9}$ M.

Die genaue Struktur ist in nachfolgender Abbildung dargestellt (aus 41).



4.1.2. Pharmakologische Wirkungen des Vinblastins

4.1.2.1. Mitosehemmung

Vinblastin ist in der Lage, proliferierende Zellen in der Mitose zu hemmen. Die Metaphasenarretierung beruht darauf, daß sich Vinblastin an die Mikrotubuli bindet, welche unter anderem auch die Mitosespindeln bilden, und diese depolymerisiert. Die aufgelösten Mikrotubuli

formieren sich im Zellinnern zu parakristallinen, doppeltbrechenden Einschlusskörperchen mit 8µm Seitenlänge (3,6). Die Schwellendosis, ab der Mitosehemmung stattfindet, wird in der Literatur mit 0,0167 µg/ml (29), beziehungsweise 0,01 µg/ml (20) angegeben. Allerdings tritt erst bei höheren Dosen eine Metaphasenarretierung aller exponierten Zellen auf. Das Bild der durch Vinblastin arretierten Zellen entspricht dem einer C-Mitose. Sie ist als eine "durch partielle oder vollständige Inaktivierung der Kernspindel in ihrem Ablauf gehemmte Mitoseform ... von Chromosomen, deren Teilung nicht über die autonome Trennung der Chromatiden hinauskommt, so daß C-Paare gebildet werden", definiert (29). Es werden aber auch in geringem Maße andere Chromosomenanordnungen, vielkernige und pyknotische Zellen beobachtet (29).

4.1.2.2. Wirkungen auf Zellorganellen

In letzter Zeit wurde ein komplexes Wirkungsspektrum des Vinblastins auf die verschiedensten Zellorganellen im Tierversuch festgestellt. Dazu gehört Dilatation und Degeneration des Golgikomplexes (28,32), Zerstörung von Podozyten bei Nierentubuluszellen (1), Verminderung der Dictiosomen (32), Mitochondrienschädigungen (23), Ablösung der Ribosomen vom endoplasmatischen Retikulum (23), Vermehrung von Autophagozytosevacuolen (23,14). Sekretorische Leistungen werden ebenfalls behindert. So fand man ein Erlöschen der exokrinen Funktionen im Pankreas (31,30), Verminderung der Trijodthyroninsekretion der Schilddrüse (38) durch Hemmung von Pino- und Exozytose (17). Allgemein führt Vinblastin zur Erhöhung des Autophagozytosepotentials durch Erhöhung der Aktivität lyso-

somaler Enzyme (27) und gelegentlich bei höheren Konzentrationen zur Mitochondrienzerstörung. Die Schädigung dieser Organellen verursacht die Ablagerung von Fetttropfen (19), fibrotischen Materials und Globulineinschlüssen in der Zelle (40).

Am Nervengewebe wurden Behinderungen des axonalen Transports (12,28), reduzierte Aktionspotentiale (10), welche durch Azetylcholin kompensiert werden (18,22), Schädigung von myelinisierten Fasern (9) und Degeneration von noradrenergen Synapsen (2) beobachtet.

4.1.2.3. Biochemische Effekte

Der zytotoxische Effekt von Vinblastin kann durch Zugabe von bestimmten Aminosäuren verhindert oder abgeschwächt werden. So ist Glutaminsäure ein kompetitiver Hemmer der Vinblastinaufnahme in die Zelle (Creashey 1971) (6), ebenso wird die Vinblastineinwirkung auf Monocytenleukämiezellen aufgehoben durch Co-A, Tryptophan, Asparaginsäure, Arginin, Citrullin, Ornithin und alpha-Ketoglutaratsäure (30,1,16). Diese Substanzen zeigten bisher jedoch nur in vivo einen protektiven Effekt gegen Vinblastin, nicht aber in vitro. Zudem war der Antileukämieeffekt von Vinblastin und Asparaginsäure zusammen größer als von Vinblastin alleine (16). Nach heutigem Wissenstand interferiert Vinblastin mit Stoffwechselwegen die von der Glutaminsäure zum Harnstoff- und Zitronensäurezyklus führen.

Andere Untersucher fanden eine Hemmung der RNA-, DNA- (5) und Proteinsynthese in leukämischen Rinderlymphozyten, vor allem durch Durchtrittsbehinderung der Substrate durch die Zellmembran (35). Die Syntheselei-

stung war bereits nach 30-60 Minuten merklich behindert (35). An zellfreien Systemen hemmt Vinblastin stark die DNA-abhängige RNA-Polymerase. Die DNA-Polymerase wird erst ab Konzentrationen größer als 10^{-4} M behindert (36). Ebenfalls an zellfreien Systemen beobachtete man eine Hemmung der Formyl-FH₄-Synthese und der Thymidilatsynthetase. Dadurch wird der 14-C-Formiateinbau in die Nucleotide von DNA und RNA reduziert (35,39). Die Thymidinkinase in Yoshida-Asziteszellen sinkt in der S-Phase ab, nicht jedoch in zellfreien Extrakten von Leukämiezellen (39). Aus dem Reparaturenzymsystem wird als einziges der vier Enzyme die Polynucleotidligase unterdrückt (5). Vinblastin setzt die anaerobe Glykolyse, NAD- und Pyruvatkonzentrationen in Tumorzellen herab (11).

4.1.2.4. Chromosomenschäden

Ab einer Konzentration von 0,05 µg/ml werden an chinesischen Hamsterzellen strukturelle Änderungen wie Chromosomenpulverisierung (26), Spiralisierungsdefekte (13) und Chromosomenverklumpungen (8) beobachtet. Abgesehen von der Chromosomenpulverisierung traten die genannten Veränderungen auch an anderen Zellstämmen auf. Am Menschen konnten bisher keine strukturellen Aberrationen nachgewiesen werden (13).

4.1.2.5. Metabolismus

Bei Ratten ist Vinblastin bereits 5 Minuten nach einer i.v. Injektion von 5 mg/kg im Serum nicht mehr nachweisbar (6). Im menschlichen Organismus (24,25), beziehungsweise bei Hunden (7), folgt Vinblastin einer dreiteiligen Kompartimentierung mit verschiedenen Zeiten und Volumina. Die Größe der Kompartimente beim Menschen sind $16,8 \pm 9$ l, 59 ± 52 l und 1656 ± 717 l, die zuge-

hörigen Transferhalbwertszeiten liegen bei 53 und 1173 Minuten (24). Das erste Kompartiment entspricht etwa der Extrazellulärflüssigkeit, über das zweite bestehen keine klaren Vorstellungen, dem dritten entsprechen ungefähr alle weichteilhaltigen Gewebe. Diese Befunde zeigen, daß Vinblastin erst langsam an seinen Bestimmungsort gelangt und dort auch lange verweilt.

Im Menschen (24) sind nach 72 Stunden erst ca 50 % der applizierten Vinblastindosis überwiegend biliär ausgeschieden. Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit erscheint dieser Punkt besonders wichtig, weil Vinblastin gerade während langer Inkubationszeiten seine Wirkung entfaltet und deshalb die Untersuchung langer Expositionszeiten in der Zellkultur erforderlich ist.

In Studien an Ratten (42) zeigte sich eine bevorzugte Anreicherung von Vinblastin in Lymphomen, normalen Lymphknoten und im Thymusgewebe 48 Stunden nach Vinblastinapplikation. Diese selektive Anreicherung besteht nicht von Anbeginn, vielmehr ist die Zytostatikumkonzentration im Blut, im Knochenmark und in retikuloendothelialen Geweben anfangs höher, nimmt aber schneller ab als in Lymphgeweben (42).

4.2. Diskussion der eigenen Ergebnisse

4.2.1. Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse

Es wurde die Abhängigkeit des zytostatischen Effekts von Vinblastin in vitro auf chinesische Hamsterzellen in Bezug auf Einwirkungsdauer und Konzentration getestet. Auch bei niedrigeren als sonst in der Literatur angegebenen Dosen konnte noch ein zytostatischer Effekt nachgewiesen werden. Bei höheren Dosierungen, bei welchen, im Gegensatz zu der niedrigen Konzentration, partielle oder totale Mitosehemmung stattfindet, zeigte sich ein Konzentrationsunabhängiger zytotoxischer Mecha-

nismus. Allgemein fiel die Überlebensrate stetig mit der Einwirkungsdauer des Vinblastins.

4.2.2. Beschreibung der Kurven

In Abbildung 1, S.28 ist die Abhängigkeit der Überlebensrate von der Zeit für die verschiedenen Konzentrationen dargestellt. In der Abbildung sind die Mittelwerte der jeweils zusammengehörigen Überlebensraten und die entsprechenden Standardabweichungen eingezeichnet. Die Kurven zeigen einen stetigen Abfall der Überlebensrate mit zunehmender Zeit. Wenn auch gewisse Abweichungen von einer Exponentialfunktion bestehen, lassen die Daten eine exponentielle Abnahme der Überlebensrate von der Einwirkdauer vermuten. Diese Kurven sind mit zunehmender Konzentration zu niedrigeren Überlebensraten verschoben, aber in ihrer Neigung kaum von der Konzentration abhängig, mit Ausnahme der Konzentration $0,01\mu\text{g/ml}$, die deutlich flacher als alle anderen verläuft.

In Versuchen mit anderen Zytostatika fand man meistens eine exponentielle Beziehung zwischen Überlebensrate und Zeit. Deshalb wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einer Regressionsanalyse unterzogen. Die Daten der Regressionsgeraden sind in Tabelle VI aufgeführt, die Geraden selbst sind unter Heranziehung aller Werte in Abbildung 4 in die experimentell gewonnenen Ergebnisse eingetragen. Dabei fällt auf, daß die Geraden nahezu parallel verlaufen, mit Ausnahme der Geraden für die Konzentration $0,01\mu\text{g/ml}$. Sie verlaufen nicht durch den Punkt für 100 % Überlebensrate bei 0 h, welcher von der Regressionsanalyse ausgeschlossen wurde. Die Regressionsgeraden liegen bis auf drei Punkte innerhalb der Standardabweichung der einzelnen Versuchsergebnisse und beschreiben die Kurven deshalb befriedigend genau. Auch der hohe Korrelations-

Tabelle VI

Daten der Regressionsgeraden

Konzen- (µg/ml)	Schnittpunkt mit der Y-Achse (%)	Korrela- tionsko- effizient	Y-Wert für 4 h	8 h	16 h	24 h	37 h	48 h	75 h	Steigung der Geraden
--------------------	--	-----------------------------------	----------------------	-----	------	------	------	------	------	----------------------------

für alle Werte der Überlebensrate:

0,01	87,8	0,84		70,6	56,7	45,6	32,0	23,7	11,3	- 0,0272
0,1	182,98	0,92		77,87	33,14	14,11	3,62	1,09		- 0,11
1,0	134,6	0,94	87,41	56,77	23,94	10,1	2,48	0,76		- 0,11
5,0	114,98	0,95	76,27	48,66	19,81	8,07	1,87			- 0,11
10,0	84,47	0,84	50,94	30,72	11,18	4,06				- 0,13
20,0	59,77	0,93	34,32	19,7	6,5	2,14				- 0,14

für alle Überlebensraten unter 50 %:

0,1	220,74	0,89								- 0,11
1,0	173,0	0,91								- 0,11
5,0	117,92	0,90								- 0,11

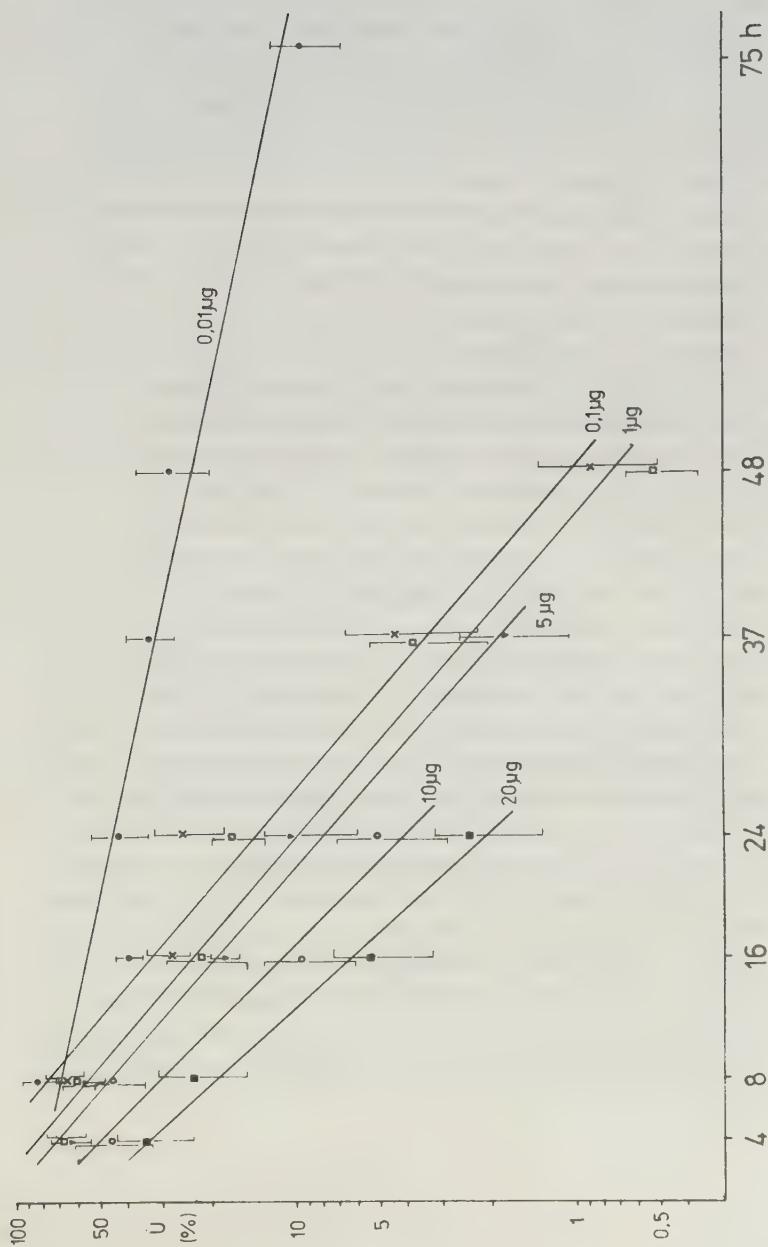


Abb. 4: Beziehung zwischen Überlebensrate (Ü) und Einwirkdauer.

Darstellung wie in Abb. 1, eingezeichnet sind jedoch die in Tabelle VI aufgeführten Regressionsgeraden für alle Werte.

koeffizient (Tab. VI) zeigt, daß die Regressionsgeraden eine gute Annäherung an die Versuchsergebnisse sind.

In Abbildung 2, S.29 wurde die Beziehung zwischen Konzentration und Überlebensrate für die verschiedenen Zeiten dargestellt. Auffällig ist dabei, daß die Kurven im Bereich eines 50-fachen Konzentrationsunterschiedes zwischen $0,1\mu\text{g/ml}$ und $5,0\mu\text{g/ml}$ ein Plateau durchlaufen. In diesem Bereich hat eine Konzentrationsänderung nur wenig Einfluß auf die Überlebensrate.

4.2.3. Diskussion der Kurven

Die Kurven beschreiben einen komplizierten Verlauf. Unterstellt man eine exponentielle Abhängigkeit von der Zeit, wie für andere Zytostatika und berechnet die Regressionsgeraden, Abb.3, S.31, so fällt auf, daß sie alle nahezu parallel verlaufen, rechnerisch sind die ersten drei Geraden ($0,1\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$, $5\mu\text{g/ml}$) exakt parallel. Dieser Sachverhalt läßt sich so beschreiben, daß Konzentrationsänderungen den zeitabhängigen, zytotoxischen Effekt des Vinblastins nicht verändern, sondern lediglich den Ausgangspunkt im Zeitintervall zwischen 0 h und 4 h verschieben. Die nachfolgende, relative Verminderung der Zellzahl, ist bei allen Konzentrationen annähernd gleich, d.h., die Zeitspanne, die Vinblastin benötigt, um die Überlebensrate auf die Hälfte zu erniedrigen, ist für alle Konzentrationen, die größer oder gleich $0,1\mu\text{g/ml}$ sind, gleich lang. Daran ändert sich auch nichts in der Berechnung der Regressionsgeraden, wenn man die Werte zwischen 100 % und 50 % auf Grund ihrer Streuung und starken Überlappung vom Rechenprozeß wegläßt.

Insgesamt zeigen sich im Verlauf der Kurven drei Auffälligkeiten:

1. Die Kurve für $0,01\mu\text{g/ml}$ zeigt eine exponentielle Inaktivierung, welche im Vergleich zu den restlichen weniger wirksam ist. Bei dieser Konzentration tritt nach den Ergebnissen des Koloniegrößenversuchs im Gegensatz zu den restlichen Konzentrationen keine Mitoseblockierung ein.
2. Die Kurven für Konzentrationen über $0,01\mu\text{g/ml}$ verlaufen praktisch parallel.
3. Die Kurven verlaufen nicht durch den Ausgangspunkt. Vielmehr liegen die Schnittpunkte mit der y-Achse bei höheren Konzentrationen unter 100 %. Das bedeutet, daß die Zellen im Zeitbereich von 0 h bis 4 h eine konzentrationsabhängige Schädigung erfahren. Der weitere zytocide Effekt verläuft für die nachfolgenden Zeiten konzentrationsunabhängig.

4.2.4. Plateaubildung

Ein Punkt, der weiterer Erörterung bedarf, ist die offenkundige Plateaubildung für das Zeitintervall zwischen 16 h und 24 h (Abb.1, S.28). In der graphischen Darstellung sieht es so aus, als ob die betreffenden 16 h-Werte zu niedrig ausfallen. Verantwortlich dafür könnten natürlich systematische Fehler in der Experimentieranordnung oder im -ablauf sein. Es könnte aber auch ein Artefakt sein, weil diese Zellen meistens über Nacht mit Vinblastin inkubiert waren, wo sich eventuell die Stromversorgungsbedingungen oder die CO_2 -Spannung im Inkubator ändern; Störmöglichkeiten gäbe es viele. Auch ist es durchaus denkbar, daß das biologische Wachstumsverhalten der Hamsterzellen tageszeitlichen Schwankungen unterliegt, wobei weniger endogene Rhythmen, als Störungen durch den Laborbetrieb

tagsüber dafür in Frage kommen. Unterschiedliche proliferative Stadien der Zelllinien könnten ebenfalls dafür verantwortlich sein. Valeriote und Bruce haben (34) auf die unterschiedliche Empfindlichkeit gleicher Zelllinien in Abhängigkeit vom Proliferationsstadium hingewiesen. Von der Plateaubildung sind besonders die Konzentrationen betroffen, bei denen keine vollständige Mitosehemmung eintritt (Tabelle V). Da die Zeitspanne von der Einsaat bis zum Plateau mit der Zykluszeit der Hamsterzellen zusammenfällt, wäre es denkbar, daß einige Zellen infolge Mitosearretierung dem Absterben in der nachfolgenden S-Phase entgehen. Bei Bruchowsky (4) trat diese Plateaubildung ebenfalls auf.

4.2.5. Erklärung der Zeit-Überlebensrate-Beziehung

Vorausgesetzt, der zytostatische Effekt von Vinblastin beruhte ausschließlich auf seiner mitosehemmenden Wirkung, so wäre zu erwarten, daß die Koloniebildungsfähigkeit während der Inkubationsdauer bis 24 h kontinuierlich abnimmt, um dann allmählich auf ein Plateau bei sehr kleinen Überlebensraten einzumünden. Bei synchronisierten Zellen bliebe dagegen die Koloniebildungsfähigkeit bis zum Erreichen der Metaphase konstant, um dann steil abzufallen und für Zeiten, die größer als die Zyklusdauer sind, ein Plateau bei niedrigen Überlebensraten zu bilden. Ein solches Ergebnis demonstrieren tatsächlich Bruchowsky et al. (4) an synchronisierten Earle's Zellen (Verdoppelungszeit 18 h) mit Vinblastin. Die Koloniebildungsfähigkeit war bei den genannten Untersuchern für die drei untersuchten Konzentrationen ($0,05\mu\text{g/ml}$, $0,1\mu\text{g/ml}$, $0,2\mu\text{g/ml}$) gleich. Die Konzentrationsunterschiede waren offenbar zu klein, um bei den gewählten Expositionszeiten eine Konzen-

trationsabhängigkeit nachzuweisen. Sie hätte auch in den vorliegenden Untersuchungen auf Grund des zu geringen Unterschiedes nicht konstatiert werden können. Die Koloniebildungsfähigkeit in unserer Arbeit liegt nach 24 h, wenn alle Zellen in der Mitose arretiert sein müßten, immer noch bei 17 % ($0,1\mu\text{g/ml}$), während sie in den Untersuchungen von Bruchowsky nur noch weniger als 5 % ($0,1\mu\text{g/ml}$) beträgt. Unterschiedliche Empfindlichkeiten der Zellstämme zeigen sich auch darin, daß Earle's Zellen bereits bei Konzentrationen über $0,05\mu\text{g/ml}$ vollständig in der Mitose arretiert werden, während chinesische Hamsterzellen bei $0,1\mu\text{g/ml}$ noch vereinzelte Zellteilungen aufweisen. An zwei verschiedenen Hamsterzellstämmen stellten Tucker, Owellen und Harris eine strenge Korrelation zwischen Zytotoxizität und Mitosearretierung fest (33). Je höher der Anteil metaphasenarretierter Zellen, um so geringer deren Koloniebildungsfähigkeit. Ebenso wies Bruchowsky an synchronisierten Earle's Zellen nach, daß der Verlust der Koloniebildungsfähigkeit ausschließlich während der Mitose geschieht.

Dagegen liegen nach unseren Studien komplexere Abhängigkeiten vor. Anders verhält sich auch der Hamsterzellenstamm von Madoc-Jones und Mauro (21), an dem diese einen zytotoxischen Effekt an synchronisierten Zellen nicht nur in der Mitose, sondern vor allem während der späten S-Phase zeigen konnten. Die Differenzen in den Arbeiten könnten an den verschiedenen Zellstämmen liegen, die verwendet wurden. Die beiden von Tucker et al. (33) untersuchten Zellstämme zeigten eine hundertfach verschiedene Empfindlichkeit sowohl in der zur Mitosearretierung notwendigen Dosis, als auch in der LD 50.

Die offensichtliche Divergenz der Kurven für $0,01\mu\text{g/ml}$ und den restlichen Konzentrationen beruht darauf, daß Vinblastin in Konzentrationen, die nicht in der Lage sind, die Mitose zu blockieren, trotzdem noch einen zytotoxischen Effekt ausübt, der allerdings nicht sehr ausgeprägt ist.

Mitosearretierung scheint für den konzentrationsunabhängigen Abfall der Überlebensrate mit zunehmender Expositionsdauer auf Grund der Ergebnisse in Tabelle V verantwortlich zu sein, obwohl diese eigentlich nur ab der Konzentration $1\mu\text{g/ml}$ vollständig ist. Dem Abfall der Überlebensrate könnte ein mit der Mitosearretierung zusammenhängender zytostatischer Effekt zugrundeliegen, wobei sich nicht sagen läßt, ob er mit dem Grad der Mitosearretierung korreliert; die Steilheit der Kurve würde dann vor allem durch die Rate, mit der die Zellen in die Mitose einlaufen, bedingt.

4.2.6. Überlegungen zum Mechanismus, welcher der Zeitkonzentrations-Überlebensrate-Beziehung zugrunde liegt.

Welche Mechanismen den verschiedenartigen Verlauf bei zunehmender Zeit und Konzentration bedingen, darüber lassen sich nur Theorien erwägen. Aus der Divergenz der Kurven kann man herleiten, daß es mehrere Mechanismen sein müssen, wie schon in (21) festgestellt wurde. Mitosehemmung als zytotoxischer Effekt entfällt als Möglichkeit für die $0,01\mu\text{g/ml}$ -Kurve. So bleiben die in (6,15) genannten Eingriffe in den Zellstoffwechsel, nämlich Interaktion mit Zitronensäure- und Harnstoffzyklus. Hier ist allerdings die Einschränkung zu machen, daß in Eagle's Lösung die Haupt-

antagonisten des Vinblastins enthalten sind. Glutaminsäure und Tryptophan in einer Konzentration von 292 mg/l beziehungsweise 10 mg/l befinden sich immer zusammen mit Vinblastin in den Vierkantflaschen und können dessen diesbezügliche Wirkung antagonisieren. Blockierungen der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese, die bisher nur bei Rattentumoren (6), Rinderlymphozyten (36,35) und Yoshida-Asciteszellen (5) beobachtet wurden, oder Schädigungen der Zellorganellen kommen als weitere Möglichkeit ebenfalls in Betracht. Diese Wirkungsmechanismen wurden allerdings nie an Hamsterzellen untersucht, und ihre Anwendung als Erklärung für die zytotoxischen Mechanismen im Falle der Hamsterzellen ist auf Grund der äußerst vielfältigen Ergebnisse bei Zellkulturversuchen nur mit Vorsicht anzuwenden.

Wie dieser Mechanismus auch immer beschaffen ist, er ist sicher in der Lage, auch bei noch kleineren Konzentrationen als $0,01\mu\text{g/ml}$ bei längerer Einwirkungsdauer alle eingesäten Zellen abzutöten, ohne sie dabei in der Mitose zu hemmen (siehe Ergebnisse der Spülversuche). Bei Spülart A ($5\mu\text{g/ml}$) und B ($10\mu\text{g/ml}$) waren nie Kolonien zu beobachten. Nimmt man überschlagsmäßig als Restmenge zwei bis drei Tropfen nach dem Absaugen und einen Tropfen als Volumen von $20\mu\text{l}$ an, so ist die Vinblastinkonzentration in der wiederaufgefüllten Flasche bei Bedingungen für A $0,0003\mu\text{g/ml}$, für B $3,6 \times 10^{-7}\mu\text{g/ml}$, die dann sieben Tage einwirken, und dabei einen beachtlichen zytotoxischen Effekt hatten. Interessant sind die Ergebnisse von Wells, Berry und Laing, die Primärkulturen sechs verschiedener menschlicher Tumoren mit Vinblastin testeten (37) und fanden, daß der zytotoxische Effekt bei niederen Dosen größer ist, als bei Konzentrationen, wie sie im klinischen Gebrauch üblich sind.

Die geringste Koloniebildungsfähigkeit lag bei den untersuchten Tumoren, mit Ausnahme des Seminoms, im Bereich von etwa $0,01\mu\text{g/ml}$ (bei 45 h Expositionszeit), während höhere Konzentrationen bei der selben Einwirkungsdauer höhere Überlebensraten bedingten. Damit bestätigt auch diese Arbeit einen nicht an die Mitosehemmung gekoppelten zytostatischen Effekt.

Als weitere Möglichkeiten bleibt die Interferenz mit der Thymidilatsynthese, wie sie bei Leukämiefällen gefunden wurde (39), oder Eingriffe in die anaerobe Glykolyse (11).

Zuletzt bleibt noch die Frage, was bei höheren Konzentrationen zwischen 0 h und 4 h geschieht. Für die Regressionsgeraden $0,1\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$ und $5\mu\text{g/ml}$ liegt die Extrapolationsnummer über 1, für $10\mu\text{g/ml}$ und $20\mu\text{g/ml}$ unter 1. Experimentell lassen sich darüber keine genauen Aufschlüsse gewinnen, weil die einzelnen Bereiche zu stark streuen und sich überlappen. Welcher Vorgang auch immer in dieser Zeit abläuft, er verlagert den Ausgangspunkt für die Geraden (Schnittpunkt mit der y-Achse für $t = 0$ h), bzw. verändert die Mindesteinwirkdauer. Der weitere Ablauf bleibt für alle Geraden gleich.

4.2.7. Konzentration - Überlebensrate - Beziehung

Auffällig ist, daß die Konzentration - Überlebensrate - Beziehung im Gegensatz zur Zeit - Überlebensrate - Beziehung diskontinuierlich verläuft (Abb. 2, S.29). Im doppeltlogarithmischen Maßstab zeigt sie im getesteten Bereich einen S-förmigen Verlauf. Auch er bietet einen Anhalt für die Konzentrationsabhängigkeit der zytotoxischen Mechanismen. Für verschwindend geringe Konzentrationen, wie sie nach den Spülversuchen

als Rest in den Flaschen verbleiben, wurde keine Koloniebildungsfähigkeit beobachtet, daß heißt, die Abbildung wäre dahingehend zu ergänzen, daß für sehr lange Inkubationszeiten (7 Tage) und sehr kleine Konzentrationen, eine Kurve mit einem steilen Abfall zu erwarten wäre.

4.2.8. Die mathematische Form der Dosiseffektbeziehung

Vinblastin entfaltet zytotoxische Wirkungen an chinesischen Hamsterzellen auf verschiedene Art und Weise. Zuerst ist hier der Effekt für niedrige Konzentrationen ($< 0,01 \mu\text{g/ml}$) zu nennen. Er kommt bei langen Einwirkungszeiten zur Geltung.

Der zweite **Mechanismus** führt sozusagen zu einem Sprung in der Kinetik der Vinblastinwirkung. Er ist konzentrationsunabhängig. Die Kurven für die Konzentrationen über $0,1 \mu\text{g/ml}$ folgen einer allgemeinen Exponentialfunktion mit der gleichen Neigung, unabhängig von der Konzentration. Offensichtlich hängt er mit der Metaphasenarretierung der Zellen zusammen, wie auch von anderen Untersuchern beschrieben wurde (4,8,21,33), wenn er auch nicht dessen einzige Ursache zu sein scheint.

Die dritte Komponente bedingt die Verschiebung der Exponentialfunktion entlang der y-Achse. Die Extrapolationsnummer nimmt als Funktion der Konzentration ab ($f(c)$). Dieser Effekt findet in der Anfangsphase der Vinblastinexposition statt. Diesem Mechanismus könnte z.B. die beschriebene Depolymerisation der Mikrotubuli, welche bereits nach 30 Sek. abgeschlossen ist, zugrundeliegen.

Im nachfolgenden wird die Gesamteinwirkung des Vinblastins als mathematische Gleichung für alle Konzentra-

tionen $\geq 0,1\mu\text{g/ml}$ dargestellt. Sie setzt sich auch aus zwei Komponenten zusammen, nämlich einer allgemeinen Exponentialfunktion und einer Funktion für die konzentrationsunabhängige Parallelverschiebung des Ausgangspunktes.

$$\text{Überlebensrate } (\bar{U}) = e^{-k \times t} \times f(c)$$

Aus den Ergebnissen der Arbeit wurde die Regressionsanalyse für $f(c)$ eine exponentielle Funktion ermittelt, so daß die gesamte Formel nach Berechnung, unter Ein-schluß aller experimenteller Werte, wie folgt lautet:

$$\text{Überlebensrate } (\bar{U}) = e^{-0,12 \times t} \times 1,27 \times c^{-0,19}$$

Die Einheiten dieser Gleichung sind für die Zeit (t) = Stunden, für die Konzentration (c) = $\mu\text{g/ml}$. Die Gleichung gilt im Konzentrationsbereich von $0,1\mu\text{g/ml}$ bis $20\mu\text{g/ml}$ und im Zeitbereich von 4 h bis 48 h.

4.2.9. Schlußbemerkung

Weitergehende Schlußfolgerungen, im besonderen auf die klinische Anwendung, sind derzeit nicht möglich, da verschiedene Zellkulturen unterschiedliche Empfindlichkeiten und Mechanismen aufweisen. Noch abweichender verhalten sich menschliche Tumoren auf Vinblastinapplikation in vitro (37).

Von klinischer Bedeutung dürfte vor allem der Befund sein, daß die zytotoxische Wirkung vor allem von der Einwirkungs-dauer abhängt und die Konzentration nur einen untergeordneten Einfluß hat. In weiteren Versuchen wird zu untersuchen sein, welche Bedeutung die, durch die Pharmakokinetik bedingte, zeitlich wechselnde Vinblastinkonzentration für menschliche Tumoren und zugehörige kritische Gewebe hat.

5. Zusammenfassung

In Zellversuchen mit chinesischen Hamsterzellen wurde die Abhängigkeit der Überlebensrate von Vinblastinkonzentration und -einwirkdauer ermittelt. Bei Konzentrationen $\leq 0,01 \mu\text{g/ml}$ fällt die Überlebensrate exponentiell mit der Expositionsdauer. Konzentrationen über $0,1 \mu\text{g/ml}$ verändern nur den initialen Abfall der Überlebensrate im Bereich zwischen 0 h und 4 h. Im weiteren Verlauf der Einwirkung hat der Konzentrationsunterschied keinen Einfluß auf die Verminderung der Überlebensrate. Ebenfalls tritt bei diesen Konzentrationen Mitosearretierung auf. Der entscheidende Parameter in der Vinblastinwirkung ist somit die Expositionsdauer.

Literaturverzeichnis

1. Andrews P.M.: The Effect of Vinblastin-Induced Microtubul Loss of Kidney Podocyte Morphology. American Journal of Anatomy, 150, 53-61, 1977
2. Bennet T, Gardiner S.M., Tomlinson D.R.: Selective Noradrenergic Denervation of the Heart Following Intravenous Injections of Vinblastin or Vincristin. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacology 293, 175-182, 1976
3. Bhallacharyya B., Wolff J.: Tubulin Aggregation and Disaggregation: Mediation by Two Distinct Vinblastin-binding Sites. Proc. National Academy Science. USA 73, 2375-2378, 1976
4. Bruchowsky N., Owen A., Becker J., Till E.: Effects of Vinblastin on the Proliferative Capacity of L-Cells and their Progress through the Division Cycle. Cancer Res. 25, 1232-1237, 1965
5. Cabela und Klein: Über den Einfluß von Vinblastin auf den DNA-Stoffwechsel in Tumorzellen. Wiener klinische Wochenschrift 88, 299-302, 1976
6. Creasey William: Vinca Alkaloids and Colchicine Handbook of Experimental Pharmacology: Antineoplastic and Immunesuppressive Agents XXXVIII/2, 670-694, Springer Verlag 1975
7. Creasey W., Scott A., Wei C., Kutcher J., Schwartz A., Marsch J.: Pharmacological Studies With Vinblastin in the Dog. Cancer Res. 35, 1116-1120, 1975

8. Cutts Harry: The Effect of Vincalencoblastine on Dividing Cells in Vivo. *Canc. Res.* 21, 168-172, 1961
9. Donoso J., Green L., Heller - Bettinger I., Sanson F.: Action of the Vinca Alkaloids Vincristin, Vinblastin and Desacetyl - Vinblastinamide on Axonal Fibrillar Organelles in Vitro. *Cancer Res.*, 37, 1401-1407, 1977
10. Felder: Vinblastin Influence on Nerve Conduction and Synaptic Transmission. *J. of Neuroscientific Res.* 1 121-129, 1975
11. Fusenig N., Obrecht J.: Die Wirkung des Zytostatikums Velbe^R auf den Kohlehydratstoffwechsel in Tumorzellen. 5. internationaler Kongress der Chemotherapie Bd II/2 457, 1967
12. Hammond G.R., Smith R.: Inhibition of the Rapid Movement of Optically Detectable Axonal Particles by Colchicine and Vinblastine. *Brain Res.* 128, 227-242, 1977
13. Harwich G., Rott D., J. van Zyl: Untersuchungen zur zytogenetischen Wirkung von Vinblastinsulfat auf menschliche Chromosomen in vivo. *Fortschritte Medizin* 90, 651-653, 1972
14. Hirsaeiki P., Trump B.F., Arstila A.V.: Studies of Vinblastin Induced Autophagocytosis in the Mouse Liver; The Relation of Lysosomal Changes to General Injurious Effects. *Cell Pathol.* 22, 89-109, 1976
15. Johnson I., Wright H., Svoboda G., Vlantis J.: Anti-tumor Principles Derived from Vinca Rosea Linn. *Cancer Res.* 20, 1016-1022, 1970

16. Johnson I., Vlantis J., Wright H., Mattas B.: Antitumor Principles Derived from Vinca Rosea Linn. II Further Studies of Biological Activities of Vinleucoblastin. Proc. of the Canadian Cancer Res. 4, 339-353, 1961
17. Josefsson J., Johansson G., Hansson S.: Inhibition of Induced Pinocytosis in Amoebia Proteus by Membrane Stabilizing Drugs. Acta Physiol. Scand.: 95, 270-285, 1975
18. Kovacs K., Horvath E., Szabo S., Dzau V., Reynolds E.: Effect of Vinblastin on Rat Liver Ultrastructure. Arzneimittelforschung 27, 825-828, 1977
19. Kovacs K., Horvath E.: Vinblastin Induced Ultrastructural Changes in Perisinusoidal Cells of Rat Liver Res. Experiment. Medic. 165, 245-249, 1975
20. Lettré: Zellstudien mit Vinca-Alkaloiden in vivo und vitro. Internationales Symposium über die Anwendung der Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristin, Urban und Schwarzenberg, 137-140, 1969
21. Madoc-Jones., Mauro F.: Interphase Action of Vinblastin and Vincristin: Differences in Their Lethal Action Through the Mitotic Cycle of Cultured Mammalian Cells. J. Cell Physiol. 72, 185-196, 1968
22. Mitolo-Chieppa: The Effect of Vinblastin and Vincristin on Single Nerve Fibers. Experientia 33, 366-367, 1977
23. Moe H., Mikkelsen H.: Light Microscopical and Ultrastructural Observations on the Effect of Vinblastin on Ameloblasts of Rat Incisors in Vivo. I Short-Term Effect on Secretory Ameloblasts. Acta Path. Microbiol. Scand. 85 A, 73-88, 1977

24. Owellen R., Hartke C., Hains I.: Pharmacokinetics and Metabolism of Vinblastin in Humans. *Canc. Res.* 37, 2597-2602, 1977
25. Owellen R., Hartke C.: The Pharmacokinetics of 4-acetyl Tritium Vinblastin in Two Patients. *Canc. Res.* 35, 975-980, 1975
26. Palyi I., Palyi V.: Vinblastin Induced Chromosomal Alterations in Cultured Chinese Hamster Cells. *Naturwissenschaften* 56, 287, 1969
27. Rez'G, Kiss A., BucsekM., Kovacs J.: Attachment of Ribosomes to Endoplasmatic Membranes in Mouse Pancreas. Degranulations in Vivo Caused by the Inducers of Autophagocytosis Neutral Red, Vinblastin, Puromycin and Cd⁺-Ions and Prevention by Cycloheximide. *Chem. Biol. Interact.* 13, 77-78, 1976
28. Rodríguez, Ekandia E., Cavichia J., Rodríguez M.: Hormonal Content and Ultrastructure of the Hypothalamo-Neurohypophysal System of the Rat After Injection of Vinblastin into the Median Eminence. *Journal of Endocrinology* 73, 197-205, 1977
29. Siebs W.: Mitoseablaufstörungen. III Mitteilungen zur Wirkung von Vinleukoblastin auf normale und maligne Zellen in vitro. *Zeitschrift für Zellforschung* 61, 231-275, 1963
30. Stock C., Lanary J., Grenier J., Banduin H.: Effect of Vinblastin on Pancreatic Enzymes Secretion Induced by Cyclic Nucleotide Derivates. *Experientia* 33, 1066-1068, 1977

31. Stock C., Lanary J., Grenier J., Banduin H.: Pancreatic Acinar Cell Changes Induced by Caerulein, Vinblastin Deuteriumoxide and Cytochalasin B in Vitro. Lab. Investment 38, 157-164, 1978
32. Thyberg, Moskalewski S., Friberg I.: The Effects of Colchicine and Vinblastin on the Phytohaemagglutinin Induced Transformation of Lymphocyts. Journal Cell Science 27, 183-198, 1977
33. Tucker W., Owellen J., Harris S.: Correlation of Cytotoxicity and Mitotic Spindle Dissolution by Vinblastin in Mammalian Cells. Cancer Res. 37, 4346-4348, 1977
34. Valeriote F., Bruce W.: An in Vitro Assay for Growth-Inhibiting Activity of Vinblastin. Journal of the Nation. Cancer Instit., 38, 851-856, 1967
35. Warnecke P., Seeber S.: Angriffspunkte von Vinca Alkaloiden in Protein und Nucleinsäurenstoffwechsel. Zeitschrift für Krebsforschung 71, 361-367, 1968
36. Warnecke P., Seeber S.: Angriffspunkte von Vinca Alkaloiden in Protein und Nucleinsäurenstoffwechsel leukämischer Rinderlymphozyten. Zweite Mitteilung. Zeitschrift für Krebsforschung, 73, 67-74, 1961
37. Wells J., Berry R., Laing A.: Reproductive Survival in Vitro of Recurrently Explanted Human Tumor Cells Following Exposure to Vinblastin. A Suggestion for Improved Clinical Dose Schedules. European Journal of Cancer 12, 793-796, 1976

38. Williams J.: In Vitro Studies on the Nature of Vinblastin Inhibition of Thyroid Secretion. *Endocrinology* 98, 1351-1358, 1976
39. Wilmanns W.: Wirkung der Vinca-Alkaloide auf die Enzyme der Thymidilat Synthese und des Folsäure Stoffwechsels auf Leukämiezellen. *Int. Symp. über die Anwendung der Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristin.* Urban und Schwarzenberg, 149-151, 1969
40. Zolt'An S., Orsolya C., J'Anos S.: Electron Microscopic Study of Nuclear Inclusions by Vinca-Alkaloied Derivates. *Morphol. Igazsygugy: Orv. Sz.* 16, 265-269, 1976
41. Velbe^R: Pharmakologischer Prospekt der Firma Eli-Lilly.
42. Wijcik L., Hebden H., Beer C., Noble R., Gout P.: The Distribution of ³H-Vinblastin in Tumor and Host Tissue of Newborn Rats Bearing a Transplantable Lymphoma, which is Highly Sensitive to the Alkaloid. *Canc. Res.* 37, 1455-1460, 1977

Lebenslauf

Vater: Johann Roithmeyer Mutter: Martha Roithmeyer
geb.: 28. 9.1925 geb.: Stölze, am 19. 6.1931
Beruf: Molkereimeister Beruf: Hausfrau

Johann Ludwig Roithmeyer
geb.: 28. 2.1953 in 8092 Haag/Obb.

1959 - 1963 Volksschule Haag/Obb.
1963 - 1972 Luitpoldgymnasium Wasserburg/Inn
Abschluß: Abitur
1972 - 1978 Studium der Humanmedizin an der LMU
München
Abschluß: Dritter Teil der ärztlichen
Prüfung
30.10.1978 Approbation als Arzt
seit 1.1.1979 Assistenzarzt in Münchner Privatklinik

